

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：33101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21466

研究課題名(和文) G0細胞におけるテロメア維持機構の解析

研究課題名(英文) Telomere maintenance in G0 cells

研究代表者

山崎 晴丈 (YAMAZAKI, Harutake)

新潟薬科大学・応用生命科学部・助教

研究者番号：20456776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母を窒素源枯渇によりG0細胞に誘導した際のテロメア維持機構について明らかにすることを目的として研究を行った。G0細胞では増殖細胞に比べてテロメアに局在するシェルタリン蛋白質の量が1/4程度に現象していることが明らかにし、G0細胞と増殖細胞ではテロメアの構造が異なっている可能性を示唆した。シェルタリン構成蛋白質の中で、増殖細胞ではテロメラーゼの局在を負に制御しているTaz1, Rap1, Poz1の欠失株の中では、Rap1の欠失株がG0細胞での生菌率が野生型株に比べて徐々に低くなるという重要な知見を得た。このことから、Rap1がG0細胞の維持に重要な役割を果たしていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of telomere maintenance at G0 cells of *Schizosaccharomyces pombe* is largely unknown. The amount of the components of shelterin complex in G0 cells was reduced to about one quarter compared to proliferating cells, suggesting that the structure of telomere might be different between G0 and proliferating cells. The viability of a deletion mutant of Rap1, which are known to negatively regulate the localization of telomerase to telomere in proliferating cells, became lower and lower in G0 phase compared to that of a wild-type strain, suggesting that Rap1 plays an important role in G0 cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：テロメア ゲノム 分裂酵母 G0細胞

1. 研究開始当初の背景

真核生物が持つ最大の特徴の1つに線状染色体を持つことが挙げられる。真核生物は線状染色体を持つことで、減数分裂を可能にして種の多様性を増加させるという大きな利点を享受したと考えられている。しかしそれと引き換えに、DNA末端は異常なDNA二重鎖切断部位として認識される可能性が生じた。さらにDNA末端はDNAポリメラーゼの作動原理のために複製のたびに短小化するという「末端複製問題」も抱えることになった。真核生物は染色体末端にテロメアと呼ばれる領域を形成してこれらの問題を回避している。すなわち、テロメア維持に中心的な役割を果たす蛋白質複合体(シェルタリン)が、「テロメアDNA合成の逆転写酵素テロメラーゼの制御」を行うと同時に、DNA損傷認識機構からの感知を防ぐ「末端保護」という機能を果たしている。

このように全真核生物に共通の重要なシステムであるテロメア維持機構の研究は、当初、出芽酵母をモデル生物として発展してきた。近年では分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* とは哺乳類のテロメア結合蛋白質の相同性が非常に高いこともあり、分裂酵母でのテロメア研究も精力的に進められている(図1)。上述したように、テロメアではDNA末端がDNA損傷認識機構に認識されないようにする必要があるが、一方で少なくとも分裂酵母においては、DNA損傷認識機構の最上流に位置するキナーゼ ATM/ATR がテロメアの維持に必要であることが分かっていた(Nat. Genet., 18(1):65-68, 1998)。そこで我々は、この課題の解決に取り組み、「シェルタリン因子の Ccq1 が ATM/ATR の下流へのシグナル伝達を抑えつつ(末端の保護)、自らが ATM/ATR によってリン酸化されることでテロメラーゼをテロメアへリクルートする」という巧妙なテロメア維持機構を明らかにした(Genes & Development, 26(3):241-246, 2012)。しかしながら、G0細胞をはじめとした、増殖を停止した細胞でのテロメア維持機構については、このような増殖細胞での知見が当てはまるのかといった基本的な問題をはじめ、これまでほとんど研究がなされてこなかった。

2. 研究の目的

本研究はこれまでまったく焦点が当てられてこなかった、G0細胞におけるテロメア維持機構の解明を目的とした。ヒトをはじめ多細胞生物を構成する分化した細胞や幹細胞(癌幹細胞を含む)はG0期の状態で機能していることが多い。また、野生の酵母は生涯のほとんどを栄養飢餓で分裂できない状態で生存し続ける。そのため、G0細胞のテロメア維持機構を分子レベルで明らかにすることで、線状染色体を持つ真核生物の染色体維持機構の包括的な理解が深まることは疑い得ない。

テロメラーゼの高発現は癌化の主要因の1

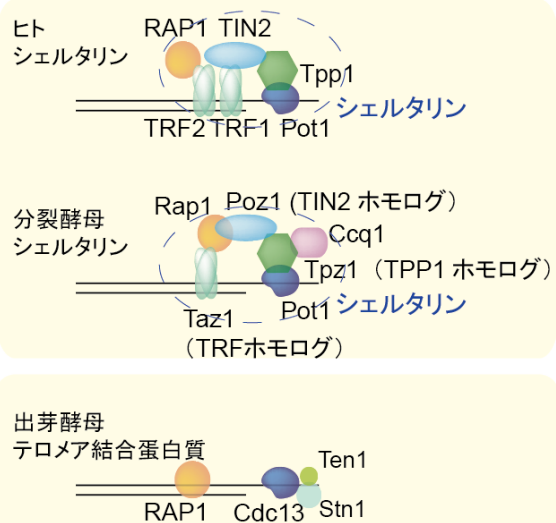


図1 酵母とヒトのテロメア構造とシェルタリン

分裂酵母とヒトでは、テロメア結合蛋白質複合体のシェルタリン因子が高度に保存されている。テロメアDNAは3'末端が一本鎖となっており、一本鎖DNAに結合するPot1と二本鎖DNAに結合するTRFの間をシェルタリン因子がつなぎ合わせるにより、一本鎖DNAと二本鎖DNAがつなぎ合ったブリッジ構造をとることが可能である。一方、出芽酵母にはシェルタリン相当因子はRap1しか存在せず、DNAはブリッジ構造を取らないと考えられている。

つであり、テロメラーゼを標的とした抗癌剤 GRN163L (Geron, 米国) がフェーズ II の臨床試験に進んでいるが、効率的にテロメア維持機能を阻害するためには、シェルタリンを標的とした薬剤も同時に必要だと考えられている。しかしながら、シェルタリンは癌細胞以外の細胞のテロメアにも局在しているため、増殖細胞と G0 細胞のテロメア維持機構が異なることが明らかになれば、その違いを利用して増殖癌細胞のみを標的とした、より選択性の高い抗癌剤の開発の足がかりになることが期待される。

3. 研究の方法

(1) Molecular Cloning 等の方法や、キットに添付されている説明書に従った。

(2) 使用菌株及び培地

Schizosaccharomyces pombe 972 株 (野生型株)
Schizosaccharomyces pombe ウラシル要求性株 (*ura4-D18* 株)

またこれらの株を遺伝子操作した株も使用した。

S. pombe の培養には、YES 培地および EMM 培地を使用した。

4. 研究成果

(1) G0細胞でのシェルタリン構成蛋白質の発現量とテロメア局在

テロメアの維持に必須なシェルタリン複合体を構成する蛋白質 (Pot1, Tpz1, Ccq1, Poz1,

Rap1, Taz1) について, 増殖細胞と, 窒素源を枯渇して誘導した G0 細胞での発現量の違いについて検討した。この実験はこれまでも行っていたが, 結果が安定しないことがあったため, 必要な株の作製からやり直し, 再度検討を行った。 *S. pombe* の野生型株である 972 株を形質転換し, Pot1, Tpz1, Ccq1, Poz1, Rap1, Taz1 に Flag タグが融合された融合蛋白質が野生型蛋白質の代わりに発現する株を構築した。得られた菌株の増殖細胞と G0 細胞をトリクロロ酢酸処理後に遠心により回収して全細胞抽出液を得て, それを SDS-PAGE に供した後, 抗 Flag 抗体を用いてウェスタン解析を行った。その結果, 1 細胞中で発現していると考えられる蛋白質の量が, 増殖細胞に比べ G0 細胞では, Pot1, Tpz1, Ccq1, Poz1, Rap1 に関しては約 1/4 程度に減少していた。また以前の結果では, Taz1 は増殖細胞では発現が見られるものの, G0 細胞では発現が極端に低下していたが, 今回は他の蛋白質同様に G0 細胞では増殖細胞に比べて約 1/4 程度に減少していた。この違いは, 今回は細胞をトリクロロ酢酸処理したため, 回収途中の Taz1 蛋白質のプロテアーゼによる分解が抑えられたことに起因すると考えられる。次にこれらの株を用いてクロマチン免疫沈降法を用いて, シェルタリン構成蛋白質がテロメアに局在している量を検討した。これらの実験も以前に行っていたが, DNA 抽出の方法を変更することにより, より安定した結果を得られるようにした。その結果, 以前の結果と異なり, 免疫沈降後に Taz1 のテロメア局在が G0 細胞で減少していることを示唆する結果を得た。これらのことから, G0 細胞では増殖細胞と異なるテロメア構造を取っている可能性が考えられた。また同様の実験をウラシル要求性の株で行ったところ, 栄養要求性がない野生型株に比べて G0 細胞での Ccq1 の発現が極端に低下しているという以前の結果を確認した。しかしながら同時に生菌率を測定してみると, 窒素源枯渇により G0 細胞導入後の少なくとも一日は, 野生型株とウラシル要求性株の間に顕著な生菌率の差がなく, その後, 徐々にウラシル要求性株は生菌率の低下が見られた。これらのことから, 細胞の栄養状態によって G0 細胞のテロメア構造が大きく異なっている可能性と, G0 細胞でのテロメア維持機構が増殖細胞と異なっている可能性が考えられた。

(2) *taz1⁺*, *rap1⁺*, *poz1⁺* の破壊株の G0 期の表現型

taz1⁺, *rap1⁺*, *poz1⁺* の破壊株を作製し, 増殖細胞と G0 細胞 (窒素源枯渇により誘導) の生菌率を測定した。その結果, *poz1⁺* 破壊株は野生型株と同程度の生菌率であった。一方, *taz1⁺* 破壊株は窒素源枯渇後 5 日目まで野生型株よりも生菌率が低下したが, それ以降 13 日目まで生菌率が低下することはなかった。また, *rap1⁺* の破壊株は野生型株に比べ徐々に

生菌率が低下し, その低下が *taz1⁺* 破壊株の時のように止まることはなかった。*taz1⁺* 破壊株の窒素源枯渇後の生菌率の低下は, G0 細胞の導入に Taz1 が必要だが, G0 細胞の維持には必要ではないとするこれまでの報告 (Mol. Cell, 7:55-63, 2001) と合致する。増殖細胞においては, Taz1, Rap1, Poz1 はテロメーアのテロメアのリクルートを負に制御するという共通の機能があることが知られているが, *taz1⁺*, *rap1⁺*, *poz1⁺* の破壊株が野生型株に比べて大幅な生菌率の低下を示すことはない。以上のことから, G0 細胞のテロメア維持機構においては, Rap1 が Taz1 や Poz1 と共通の増殖細胞での機能の他に, Taz1 と Poz1 とは独立の機能を G0 細胞で果たしているのではないかとという重要な知見が得られた (図 2)。その際, Rap1 に結合する未知の因子を介

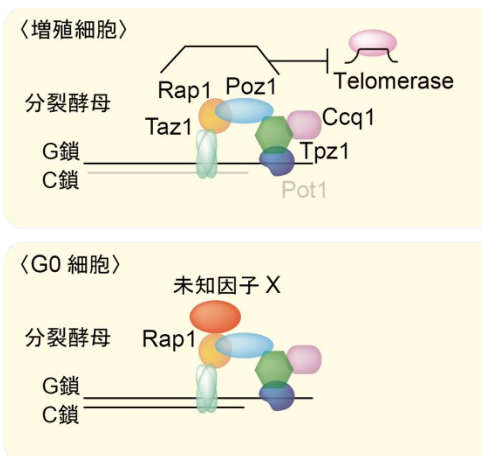


図 2 G0 細胞でのテロメア維持機構

Taz1, Rap1, Poz1 は, 増殖細胞ではテロメーアのテロメア局在を負に制御するという共通の機能を有している。一方, G0 細胞においては, それら 3 因子の中で Rap1 が未知の因子 X を介してテロメアの保護に関与している可能性がある。してその機能を発揮しているかについては今後の検討課題である。

(3) テロメア領域の G0 期のヘテロクロマチンの動態

G0 細胞では細胞核が凝縮することから, テロメア周辺のヘテロクロマチンが亢進している可能性についても検討した。テロメア領域のヘテロクロマチン化には, SHREC と呼ばれるヒストン脱アセチル化酵素 Clr3 を含む複合体が Taz1-Rap1-Poz1-Ccq1 を通じてテロメアに局在化することが必要であると考えられている。まずテロメアから 10 kb, 30 kb, 563 kb のところにカナマイシン耐性遺伝子を挿入した。テロメア近傍への遺伝子の導入はヘテロクロマチンの影響で効率が悪いので, まずヘテロクロマチン形成に必要な *swi6⁺* を破壊した後に目的の位置にカナマイシン耐性遺伝子を挿入し, その後, 性的異なる野生株と掛け合わせるにより *swi6⁺* を野生型に持つ株を選抜した。これらの株を窒素源枯渇により G0 細胞へと移行させた後, G418 を

添加して、一定期間培養後、G418 非含有培地でのコロニー形成率を測定した。またコントロールとして、増殖細胞に G418 を添加した後、G418 非含有培地でのコロニー形成率を測定した。その結果、どの株においても、コロニー形成効率に変化はなかったことから、テロメア近傍のカナマイシン耐性遺伝子の発現量は、増殖細胞と G0 細胞で大きな差がないと考えられた。このことから、増殖細胞と G0 細胞でテロメア近傍のヘテロクロマチン状態に変化はないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

新潟薬科大学応用生命科学部応用微生物学
研究室ホームページ

<http://www2.nupals.ac.jp/~oubi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 晴丈 (YAMAZAKI, Harutake)

新潟薬科大学・応用生命科学部・助教

研究者番号：20456776

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

高久 洋暁 (TAKAKU, Hiroaki)

新潟薬科大学・応用生命科学部・教授